

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMIA Y VETERINARIA



“Trabajo Final presentado para optar al Grado de Ingeniero
Agrónomo”

Modalidad: Proyecto

**Actividad biocontroladora de rannolípidos producidos por
Pseudomonas aeruginosa sobre hongos patógenos de maní**

Alumna: Fitzimons, Georgina Natalí

DNI: 33.177.637

Director: Dra. Marta Susana Dardanelli (FCEFQyN)

Co-Director: Dra. Alicia Thuar (FAyV)

Río Cuarto - Córdoba

Agosto/2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final: Actividad biocontroladora de
ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* sobre
hongos patógenos de maní.

Autor: **Fitzimons, Georgina Natalí**

DNI: 33.177.637

Director: Dra. Marta Susana Dardanelli (FCEFQyN)

Co-Director: Dra. Alicia Thuar (FAyV)

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias del

Jurado Evaluador:

Ing. Agr. Andrés, Javier _____

Ing. Agr. Bruno, Carla _____

Fecha de Presentación: ____/____/____

Aprobado por Secretaría Académica: ____/____/____.

Secretario Académico

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional de Río Cuarto, por abrir sus puertas a jóvenes como yo, darme la oportunidad de estudiar, prepararme para un futuro competitivo y formarme como persona.
- A mi Director de Tesis, Dr. Lucas Gallarato por dedicarme su tiempo y esfuerzo, de manera adecuada, aportándome su experiencia, conocimientos, capacidad.
- A la Dra. Vicky Dardanelli por abrirme las puertas al lab.17 y por la oportunidad que me diste de realizar este trabajo.
- A mi familia, por ser quienes, a lo largo de toda mi vida, han apoyado y motivado mi formación académica, por la educación que me han brindado, porque creyeron en mí en todo momento y no dudaron de mis habilidades.
- A mi novio por el apoyo en todo momento, para realizar este trabajo y para concretar la meta personal de concluir la carrera.
- A mis amigos y compañeros de estudio por compartir momentos inolvidables en esta facultad, que me han servido de motivación para poder llevar a cabo este trabajo.
- A la gente del laboratorio 17, por hacerme sentir tan cómoda en su laboratorio.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	1
OBJETIVOS GENERALES.....	6
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
RESULTADOS.....	11
DISCUSIÓN.....	27
CONCLUSIÓN.....	30
BIBLIOGRAFÍA.....	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Comparación de crecimiento con respecto al control de <i>Sclerotinia minor</i>	11
Tabla II. Comparación de crecimiento con respecto al control de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	12
Tabla III. Comparación de crecimiento con respecto al control de <i>Sclerotium rolfsii</i>	13
Tabla IV. Comparación de crecimiento con respecto al control de <i>Fusarium solani</i>	14
Tabla V. Comparación de crecimiento con respecto al control de <i>Rhizoctonia solani</i>	15
Tabla VI. Crecimiento de cada patógeno en distintas dosis de ramnolípidos, primera repetición.....	17
Tabla VII. Crecimiento de cada patógeno en distintas dosis ramnolípidos, segunda repetición.....	17
Tabla VIII. Peso individual fresco y seco de raíz y tallos de <i>A. hypogaea</i> para cada tratamiento.....	21
Tabla IX. : Promedio y desvíos de pesos frescos y secos de raíz y tallos de <i>A. hypogaea</i> para cada tratamiento.....	22
Tabla X. Anova de peso fresco de tallo.....	23
Tabla XI. Anova de peso fresco de raíz.....	24
Tabla XII. Anova de peso seco de tallo.....	24
Tabla XIII. Anova de peso seco de raíz.....	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. : <i>Sclerotinia minor</i>, agente causal del tizón de maní, utilizando diferentes dosis de ramnolípidos.....	11
Figura 2. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>, agente causal de, utilizando diferentes dosis de ramnolípidos.....	12
Figura 3. <i>Sclerotium rolfsii</i> agente causal de marchitamiento de maní, utilizando diferentes dosis de ramnolípidos.....	13
Figura 4. <i>Fusarium solani</i> agente causal de la podredumbre parda de la raíz de maní, utilizando diferentes dosis de ramnolípidos.....	14
Figura 5. <i>Rhizoctonia solani</i> agente causal de damping-off, utilizando diferentes dosis de ramnolípidos.....	15
Figura 6. Determinación del diámetro de inhibición del micelio de especies fúngicas frente a diferentes dosis de ramnolípidos.....	16
Figura 7. Plantas de Maní de 33 días. Ensayo Pretratado, donde se adicionó a la semilla 0,1g de ramnolípidos.....	18
Figura 8. Plantas de Maní tratamiento 33 días. Ensayo Tratamiento, donde se adicionó a las plántulas 0,1g de ramnolípidos a los 15 y 25 días.....	19
Figura 9. Plantas de Maní 33 días. Ensayo Pretratado, donde se adicionó a la semilla 1g de ramnolípidos.....	19
Figura 10. Plantas de Maní tratamiento 33 días. Ensayo Tratamiento, donde se adicionó a las plántulas 1g de ramnolípidos a los 15 y 25 días.....	20
Figura 11. Plantas de Maní Control de 33 días de crecimiento.....	20

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Relación peso fresco y seco de raíz y tallos para cada tratamiento.....	25
--	----

RESUMEN

Actividad biocontroladora de ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* sobre hongos patógenos de maní.

Sclerotinia minor, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* son agentes patógenos en el cultivo de maní y son considerados limitantes de la producción de este cultivo en el país. El control habitual de estos patógenos se realiza con fungicidas de tipo sistémico, que incrementan los costos de producción, pueden inducir la resistencia del patógeno y tienen un impacto negativo en el ambiente. Por tanto, se llevó a cabo este estudio con el propósito de buscar alternativas amigables con el ambiente, que formen parte de un paquete tecnológico eficaz de control. El objetivo de esta investigación fue evaluar la acción biocontroladora que los ramnolípidos producidos por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* tienen sobre hongos patógenos de maní. Los ramnolípidos producidos por la bacteria y obtenidos por diferentes métodos y en distintas concentraciones fueron aplicados sobre tacos de hongos en un medio de cultivo de Agar Papa Glucosado *in vitro* en condiciones controladas. Los resultados demostraron la capacidad que tienen los biosurfactantes para controlar el crecimiento y/o desarrollo de los patógenos, ya que *Pseudomonas aeruginosa* logró reducir en la mayoría de los casos el crecimiento en más de un 50%, aunque también hubo inhibiciones de crecimiento del 100%. Los resultados de esta investigación muestran el potencial que tienen los biosurfactantes para el control de patógenos de maní.

Palabras clave: biosurfactantes, ramnolípidos, condiciones controladas, patógenos, maní, *Pseudomonas aeruginosa*.

SUMMARY

Biocontrol agent of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* on pathogenic fungi of peanut.

Sclerotinia minor, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* are pathogenic agents in peanut cultivation and are considered limiting the production of this crop in the country. The usual control of these pathogens is made with systemic fungicides, which increase production costs, induce resistance of the pathogen and have a negative impact on the environment. Therefore, this study was carried out in order to find environmentally friendly alternatives, which are part of an effective technological control package. The objective of this research was to evaluate the biocontrol action that the rhamnolipids produced by the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* had on pathogenic peanut fungi. The rhamnolipids produced by the same and obtained by different methods and in different concentrations were applied on fungi blocks in a culture medium of Glucose Papa *In vitro* under controlled conditions. The results demonstrated the ability of biosurfactants to control the growth and / or development of pathogens, since *Pseudomonas aeruginosa* was able to reduce in most cases growth by more than 50%, although there were inhibitions of growth of 100 %. The results of this research show the potential of biosurfactants for the control of peanut pathogens.

Key words: *biosurfactants*, *rhamnolipids*, *controlled conditions*, *pathogens*, *peanut*, *Pseudomonas aeruginosa*.

INTRODUCCIÓN

Los surfactantes son compuestos que influyen por medio de la tensión superficial en la superficie de contacto entre dos fases (líquido – líquido o líquido – aire), propiedad determinada por la estructura de su molécula. Son compuestos anfibólicos, es decir que están formados por dos partes con diferente relación con los solventes, una de ellas tiene afinidad por solventes polares como el agua, y la otra por solventes apolares (por ejemplo aceite).

Existe una amplia variedad de microorganismos que tienen la capacidad de sintetizar compuestos de este tipo, los cuales se denominan biosurfactantes. Entre los microorganismos productores de importancia hay bacterias, hongos y levaduras (Banat *et al.*, 2010; Satpute *et al.*, 2010). Los diferentes tipos de biosurfactantes tienen diversas propiedades físico-químicas y estructurales y en base a ello se clasifican en glicolípidos, lipopéptidos, lípidos neutros, fosfolípidos, ácidos grasos y compuestos poliméricos (Amaral *et al.*, 2010; Cameotra *et al.*, 2010; Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2011). En los microorganismos, se ha propuesto todo un espectro de funciones de estos compuestos, como el acceso a los nutrientes, el movimiento y competencia celular, la patogénesis de animales y plantas, la comunicación celular y la unión a superficies (Neu, 1996; Ron y Rosenberg, 2001; Van Hamme *et al.*, 2006). De todas ellas, quizás la más ampliamente discutida sea la función de permitir a los organismos que los sintetizan, el acceso a los nutrientes gracias a su acción emulsionante y solubilizante sobre sustratos poco solubles en agua. Es por esto que los microorganismos productores de biosurfactantes ganan competitividad respecto a aquellos no productores en cuanto a la biodisponibilidad de nutrientes. Por otra parte, muchos de ellos han demostrado su acción antimicrobiana, en general, con efectos más marcados sobre microorganismos Gram positivos que sobre Gram negativos, debido a diferencias en la estructura de su pared celular. Así mismo, también se han encontrado propiedades antifúngicas y antivirales en algunas de estas moléculas (Sachdev y Cameotra, 2013).

Se considera que los biosurfactantes son agentes dispersantes y humectantes cuando son sintetizados por microorganismos que provocan infecciones en animales y plantas. En el caso de las plantas, estos aumentan la humedad al interactuar con la capa cuticular cerosa hidrofóbica que las recubre lo que puede favorecer la infección (Sachdev y Cameotra, 2013). Estas propiedades y la necesidad de realizar prácticas agrícolas e industriales respetuosas del medio ambiente, han generado un marcado interés para la caracterización de los biosurfactantes ya descritos como así también para la búsqueda de nuevas moléculas (Rodrigues *et al.*, 2006; Nitschkey Costa, 2007; Lourith y Kanlayavattanakul, 2009; Banat *et al.*, 2010; Das *et al.*, 2010).

Biosurfactantes frente a surfactantes sintéticos

Los problemas ambientales que lleva aparejado el uso de los surfactantes químicos, ha generado que se acreciente el interés por el uso de los biosurfactantes (Kitamoto *et al.*, 2002; Rahman y Gakpe, 2008). Estos presentan algunas ventajas frente a los surfactantes químicos:

- *Biodegradabilidad, baja toxicidad y biocompatibilidad*: son las características relevantes que suscitaron el interés sobre los biosurfactantes. Los surfactantes químicos presentan alta resistencia a la degradación por microorganismos y alta toxicidad cuando se acumulan en el medio ambiente. La biocompatibilidad es esencial para su aplicación en medioambiente, cosmética, industria farmacéutica y como aditivos en la industria alimentaria.

- *Diversidad de estructuras y propiedades físico-químicas*: son moléculas complejas producto del proceso evolutivo y acorde con las necesidades de los microorganismos que las producen. Esto se traduce en una alta especificidad.

- *Importante actividad superficial, con adsorción gradual y actividad continuada*: esto hace que la eficacia se equipare y en algunos casos aventaje a la de los surfactantes químicos.

- *Efecto en condiciones extremas de temperaturas, valores de pH, fuerza iónica y presión*: características notables para su potencial empleo en la industria, la medicina y el medio ambiente, donde frecuentemente los procesos requieren exposiciones a condiciones extremas.

A pesar de estas ventajas, por el momento la mayoría de los biosurfactantes aún no son de gran aplicación como los productos de síntesis química, debido esencialmente a tres aspectos principales, los cuales deben mejorarse para intensificar su producción y empleo y que son el costo, la funcionalidad y la capacidad de producción (Lin, 1996; Mukherjee *et al.*, 2006).

Ramrólpidos

Dentro de los biosurfactantes, los glicolípidos son los más estudiados debido a su alta tasa de producción y a la utilización de sustratos renovables como fuente de carbono por parte de los microorganismos productores. Dentro de los glicolípidos con propiedades biosurfactantes se encuentran los *ramrólpidos*, producidos por diversas especies de bacterias destacándose *Pseudomonas aeruginosa*. Esta bacteria Gram negativa, pertenece a la clase Gamma Proteobacteria según la secuenciación de rRNA 16s, y a la familia Pseudomonadaceae. Son bacilos rectos o ligeramente curvados con flagelo polar no fermentativas y desnitrificantes, pudiendo utilizar nitrato como aceptor de electrones incluso en presencia de O₂. Es un microorganismo ecológicamente importante, pudiendo encontrarse en suelo y agua, y ser potencialmente patógena de plantas y animales (Madigan *et al.*, 1997).

La síntesis de ramnolípidos está regulada por un sistema sensor de quórum o de señalización célula-célula (Ochsner y Reiser, 1995). Se trata de una regulación genética dependiente de la densidad celular mediada por la acumulación en el medio externo de una o más moléculas señal, las cuales son permeables a la membrana.

Acción controladora sobre patógenos de plantas

Se ha demostrado que algunos biosurfactantes tienen actividad antagonista frente a patógenos de plantas (biocontroladores), y son considerados como una promisoriosa alternativa al control por métodos químicos, lo que permitiría lograr una agricultura sustentable (Nihorimbere *et al.*, 2011). Estudios a campo, han demostrado el rol de los biosurfactantes en la mejora de la actividad contra insectos (Jazzar y Hammad, 2003) y en hongos como *Aspergillus* sp., los cuales infectan semillas de cultivo como algodón, maní y maíz durante el almacenamiento, así como en la producción a campo (Rodríguez y Mahoney, 1994). Algunos de los ejemplos referenciados y que demuestran este accionar biocontrolador de los ramnolípidos son: el control contra el pulgón verde del durazno (*Myzus persicae*) por parte de *Pseudomonas* sp EP-3 aislada de suelo (Kim *et al.*, 2011); la lisis de las zoosporas del oomicete patógeno *Phytophthora capsici*, agente causal del damping-off de pepino (Kruijt *et al.*, 2009) así como cultivos de soja y maní por parte de *Pseudomonas putida*; la inhibición del crecimiento del hongo patógeno *Pythium ultimum* (agente causal del damping off de raíces de plantas de hortalizas y cultivos extensivos), de *Fusarium oxysporum* (agente causal del marchitamiento en soja por ejemplo), y *Phytophthora cryptogea* (causa la pudrición de las frutas y las flores) por parte de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas aeruginosa* (Hultberg *et al.*, 2008 a y b); el biocontrol contra *Verticillium microsclerotia*, causante de la podredumbre de la papa y de *Rhizoctonia solani*, agente causal de numerosas enfermedades en plantas mediada por ramnolípidos de *Pseudomonas aeruginosa* (Debode *et al.*, 2007).

Los ejemplos anteriores demuestran que los biosurfactantes se encuentran bien documentados en la literatura, debido a la promoción de crecimiento de las plantas por el efecto perjudicial sobre los agentes patógenos. Por lo tanto, estos biosurfactantes y/o la producción de microorganismos de estas moléculas son posibles sustitutos de pesticidas e insecticidas que se utilizan actualmente en la agricultura, los cuales en su gran mayoría son tóxicos y no biodegradables, acumulándose en los suelos y contaminando el agua y los alimentos. Pero aún no existen evidencias experimentales de tratamiento con ramnolípidos en cultivos de extensión que sufren del ataque de variados patógenos, como por ejemplo el maní y que será el cultivo a ensayar en nuestro caso.

El cultivo de maní

El maní pertenece a la familia Leguminosae, subfamilia Papilionoideae y género *Arachis* (Lavin *et al.*, 2001; Doyle y Luckow, 2003). Del género, solo *A. hypogaea* L. tiene importancia agronómica y es conocida como maní o cacahuete. Las plantas de maní son anuales con un crecimiento indeterminado y son utilizadas como fuente de materia prima para las industrias aceiteras y de confitería, además de su exportación, como producto primario o elaborado (Cholaki *et al.*, 1983). La parte aérea también es empleada como alimento para cerdos y ganado, incluso un producto residual como lo es la cáscara está siendo empleada en nuevos emprendimientos comerciales (Gatani y Argüello, 2005).

Actualmente el maní es cultivado en diferentes regiones del mundo y la producción mundial estimada es de 35,98 millones de toneladas. De acuerdo al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), China lidera la producción de maní teniendo un 37,5% de la producción total, seguido por India, Estados Unidos, Argentina y Vietnam. En Argentina un 87% de la producción de maní tiene lugar en la Provincia de Córdoba, obteniéndose un grano de gran calidad y donde casi toda la producción es exportada a la Unión Europea, Indonesia y Canadá (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos 2008 <<http://www.sagpya.mecon.gov.ar>>). La proyección de superficie de siembra de maní en Argentina hacia el 2015 se estima en 280 mil ha, contra las 250 mil previstas para esta última campaña 2013-2014. Su cultivo constituye una de las principales economías regionales ya que emplea en la provincia de Córdoba a unas 10.000 personas en forma directa, existiendo unas 25 plantas procesadoras, entre las cuales se encuentran cooperativas, empresas de capitales nacionales e internacionales y esta actividad contribuye al sostén económico de numerosos pueblos del interior de la provincia (SAGPyA 2004). Debido al potencial productivo existente y a la baja demanda de consumo interno, el maní es un producto que se siembra principalmente para exportar y así nuestro país se ha transformado en el segundo exportador mundial de maní, detrás de China, y es el principal proveedor de maní tipo confitería para la Unión Europea (Cámara Argentina de Maní, <<http://www.camaradelmani.com.ar>>). Las exigencias del mercado de consumo para con los productos exportados, implican un desafío no solo para el sector agroindustrial, sino para el sector académico-científico el cuál debe aportar conocimientos que permitan una agricultura sustentable y respetuosa a fin de optimizar la producción de maní (Andreani, 2009).

Los hongos en el cultivo de maní

Las pérdidas de cosecha que producen las enfermedades causadas por hongos de suelo en maní han sido señaladas explícitamente por el sector productivo, como uno de los principales factores de la crisis de este cultivo a fines de la década de 1990. Las pérdidas por hongos del suelo fueron entonces, una de las causas en la disminución del área sembrada y el desplazamiento del cultivo hacia el sur como estrategia de “escape” a este problema sanitario. Los patógenos comúnmente encontrados causando muerte de plantas y/o podredumbre de vainas en un cultivo de maní son, el tizón del maní (*Sclerotinia minor* y *S. sclerotiorum*), el marchitamiento del maní u hongo blanco (*Sclerotium rolfsii*), la podredumbre parda de la raíz (*Fusarium solani*) y damping off (*Rhizoctonia solari*) (March *et al.*, 2004).

La muerte de plantas es como consecuencia de la acción de estos organismos a nivel de raíz y cuello donde se inicia la infección, se observa en la parte aérea un marchitamiento total o parcial de las ramas, las que van adquiriendo una coloración castaña hasta que se produce la muerte de las plantas. Los daños causados se acentúan a medida que avanza el otoño manifestándose con mayor intensidad y en forma más generalizada cuando las plantas se encuentran en el período de llenado de vainas (fines de febrero en adelante) (Pedelini, 2008).

La podredumbre de frutos (podredumbre de cajas y granos) que produce la destrucción parcial o total de los mismos, es de gran importancia en la producción de maní. Cuando las condiciones climáticas impiden la cosecha oportuna, las pérdidas pueden ser cuantiosas. Los hongos asociados a esta enfermedad son comunes a los causales de podredumbre de raíz y tallo. El control de estas enfermedades resulta difícil ya que los agentes causales permanecen en el terreno a través de sus formas de resistencia o viven sobre restos vegetales. Las enfermedades fúngicas, especialmente las producidas por fitopatógenos, limitan la producción de esta leguminosa en toda la provincia. (Pedelini, 2008).

Hipótesis

Los ramnolípidos producidos por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* poseen actividad biocontroladora inhibiendo el crecimiento de hongos patógenos de cultivos de maní.

Objetivo General

Estudiar la producción y el efecto de los ramnolípidos sintetizados por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* sobre el crecimiento de hongos patógenos de maní, cultivo de gran importancia económica en la región. De esta manera se pretende aportar al conocimiento general de estos procesos, datos que serán relevantes y que podrán ser utilizados para modificar prácticas agronómicas que provocan situaciones adversas en nuestro medio ambiente.

Objetivos específicos

- 1- Optimizar la producción de ramnolípidos por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, modificando la composición del medio de cultivo y las condiciones de crecimiento.
- 2- Estudiar el efecto de los ramnolípidos producidos sobre el crecimiento de hongos patógenos de maní.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Biología Molecular de la FCEFQyN, la cual dispone de toda la infraestructura necesaria para el desarrollo de este plan de tesis. A continuación se detalla el material de estudio y los procedimientos experimentales.

1- Organismos y condiciones de cultivo

Microorganismos:

Se utilizó la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 obtenido del Centro de Colección de la Universidad de Washington (EEUU). Los hongos utilizados, patógenos de maní, fueron: *Fusarium solani*; *Sclerotinia minor*; *Sclerotinia sclerotiorum*; *Sclerotium rolfsii* y *Rhizotocnia solani*, los cuales fueron cedidos gentilmente por la Dra. Susana Rosas (UNRC).

Medio de cultivo y optimización de la producción de ramnolípidos:

El inóculo bacteriano fue crecido en medio LB (Tripteina 1g/litro; extracto de levadura 0,5g/litro; NaCl 0,5 g/litro) por 24 h. a 37°C y 150 rpm de agitación. Luego se inoculó al 1% en el medio de cultivo descrito en Silva *et al.*, (2010), utilizado para la producción de ramnolípidos. El mismo contiene 0,05 g/L de MgSO₄; 0,1 g/L de KCl; 2,0 g/L de citrato de sodio; 0,28 g/L de FeCl₃; 1.4 g/L de ZnSO₄; 1,2 g/L de CoCl₂; 1,2 g/L de CuSO₄ y 0,8 g/L de MnSO₄. Como fuente de nitrógeno se utilizó NaNO₃ al 0,3% y como fuente de carbono glicerol al 3%. La optimización de la producción de ramnolípidos se realizó variando la fuente y concentración del compuesto carbonado en el medio y comparando el rendimiento con la fuente utilizada como control (glicerol). Se ensayó con aceites vegetales, desechos de la producción de bioetanol (glicerol rico) y derivados de petróleo (Silva *et al.*, 2010).

Para el crecimiento de los hongos y los ensayos de biocontrol, se utilizó el medio sólido agar papa glucosa (APG), utilizado como cultivo de referencia para hongos (<https://www.atcc.org/~media/CF1B6EC132F649ED97753F8444E3FE61.ashx>) en los casos en que fue necesario, se suplementó el medio APG con Estreptomina (100 µg/ml) para evitar el crecimiento bacteriano. El control negativo de la actividad biocontroladora se realizó utilizando medio de cultivo estéril y para el control positivo se utilizó el fungicida Vitavax® Flo (Laboratorio CKC – Argentina).

2- Cuantificación e identificación de los ramnolípidos producidos

La cuantificación de la molécula bacteriana se realizó por el método de antrona (Dardanelli *et al.*, 1997). Brevemente: las células fueron separadas del medio de cultivo por

centrifugación (aprox. 8000 rpm durante 10 min). El medio libre de células se colocó en tubos de plástico tipo eppendorf y se llevaron a 200 µl de volumen final con agua destilada. Se agregó 1 ml del reactivo de antrona (0,2% de antrona P/V en H₂SO₄ 75%). Los tubos se llevaron a temperatura de ebullición por 15 minutos y se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 625 nm.

3- Ensayos de biocontrol

Para la evaluación de biocontrol se llevaron a cabo dos ensayos distintos:

- Ensayos de biocontrol con medio de cultivo conteniendo ramnolípidos, en los cuales se estudió el efecto de los ramnolípidos sobre el crecimiento de los hongos.
- Ensayos de biocontrol sobre discos en diferentes concentraciones de ramnolípidos.

El primer ensayo de biocontrol con medio de cultivo conteniendo ramnolípidos se realizó teniendo en cuenta el trabajo publicado por Goswami *et al.* (2013). Brevemente, a partir de un cultivo crecido de la cepa *P. aeruginosa* en el medio de producción, se obtuvo el sobrenadante por centrifugado. Luego el mismo fue autoclavado y se cuantificó la concentración de ramnolípidos por el método de antrona. El medio de cultivo utilizado fue el Agar Papa Glucosado (APG), en el cual los hongos se desarrollan.

Para el ensayo de la actividad biocontroladora, se agregó al medio APG medio libre de células para obtener una concentración final de ramnolípidos de 0,1 g/litro y de 1g/litro. Al control negativo no se le adicionó ramnolípidos. Se midió el diámetro de crecimiento en las condiciones tratamiento y se comparó con el crecimiento en la condición control (sin ramnolípidos).

El segundo ensayo de biocontrol sobre discos en diferentes concentraciones de ramnolípidos, se realizó teniendo en cuenta el trabajo publicado por Sha *et al.* (2011). Brevemente, el ramnolípidos purificado por el método de Janek (Janek *et al.*, 2010), obtenido de la cepa de manera similar al anterior, fue inoculado en discos tipo Whatman de 25 mm² de superficie hasta saturación del mismo y para ello se utilizaron dos concentraciones, una de 80 µg y otra de 160 µg . Luego los discos fueron colocados en placas de APG, junto a los controles negativo (disco solo) y positivo (Vitavax, dosis de trabajo). La cepa del hongo a ensayar, se colocó en el centro de la placa a partir de un taco de 5 mm obtenido de una placa de APG donde el hongo creció durante 7 días en estufa a una temperatura de 28°C. La actividad biocontroladora se evaluó luego de 4 días, por determinación del diámetro de inhibición del micelio de las muestras con respecto al control positivo.

4- Evaluación de efectos de los ramnolípidos sobre plantas de maní

Teniendo en cuenta los datos del punto anterior, se evaluó sobre plantas de maní, el efecto de aquella dosis de ramnolípidos que fuese capaz de inhibir el crecimiento fúngico, a fin de establecer si sobre plantas se produce un efecto no deseado.

El ensayo se llevó a cabo en macetas que contenían 100 g de vermiculita estéril, regadas con 100 ml de agua destilada estéril. Cada maceta portó una planta, con 10 repeticiones para cada tratamiento los cuales fueron:

- Control, sin el agregado de ramnolípidos durante el crecimiento.
- Plantas tratadas con ramnolípidos, los cuales fueron aplicadas a los 15 y 25 días de colocar las plántulas en las macetas, utilizando las concentraciones determinadas en el punto 3 de materiales y métodos.
- Plantas pretratadas con ramnolípidos, a las cuales se les aplicó el ramnolípidos antes de pregerminar las semillas, después de su desinfección.

Una vez desinfectadas y pre germinadas las semillas de maní, se depositaron una por maceta. Las plantas fueron cultivadas durante 32 días en cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas de luz, 8 horas de oscuridad a 24 °C. La humedad relativa se mantuvo al 80%. Los riegos se efectuaron en días alternos a lo largo de 32 días, con agua destilada estéril y solución nutritiva Jensen. A los días señalados, se roció la totalidad de la planta (tallos y hojas) con el ramnolípidos. Al día siguiente, se tomaron nota de los cambios morfológicos observados. Se determinaron cuatro parámetros en cada ensayo: longitud de la parte aérea y raíz (cm), y peso seco de parte aérea y raíz estimados en mg/planta.

Material vegetal y desinfección superficial

El ensayo fue realizado con semillas de maní (*Arachis hypogaea* L. cv granoleico) que fueron cedidas gentilmente por el Ing. Juan Soave del Criadero El Carmen, General Cabrera, Córdoba.

Para la desinfección de las semillas, las mismas se colocaron en un frasco estéril para cubrirlas con alcohol etílico al 96% durante 45 segundos y posteriores cinco lavados con agua destilada estéril. Luego se adicionó peróxido de hidrógeno al 15% v/v, agitando suavemente durante 7 minutos y finalmente se lavaron diez veces con agua destilada estéril. Posteriormente, y luego de realizar una pre germinación de las semillas, se utilizaron en el ensayo detallado en el punto 4 de materiales y métodos.

5- Análisis de los datos experimentales

Las experiencias fueron realizadas en diseños aleatorizados y los valores representan las medias de tres repeticiones. Los datos se analizaron empleando el test de ANOVA con una comparación múltiple de variables por el test de LSD Fisher considerando diferencia significativa un nivel de $P=0,05$. Todos los análisis estadísticos se evaluaron con el software InfoStat (Estadística y Biometría, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba).

RESULTADOS

1. Ensayos de biocontrol con medio de cultivo conteniendo ramnolípidos

A continuación se presentan los resultados obtenidos de los ensayos realizados para cada especie de patógeno utilizados empleando la técnica de biocontrol con medio de cultivo conteniendo ramnolípidos.

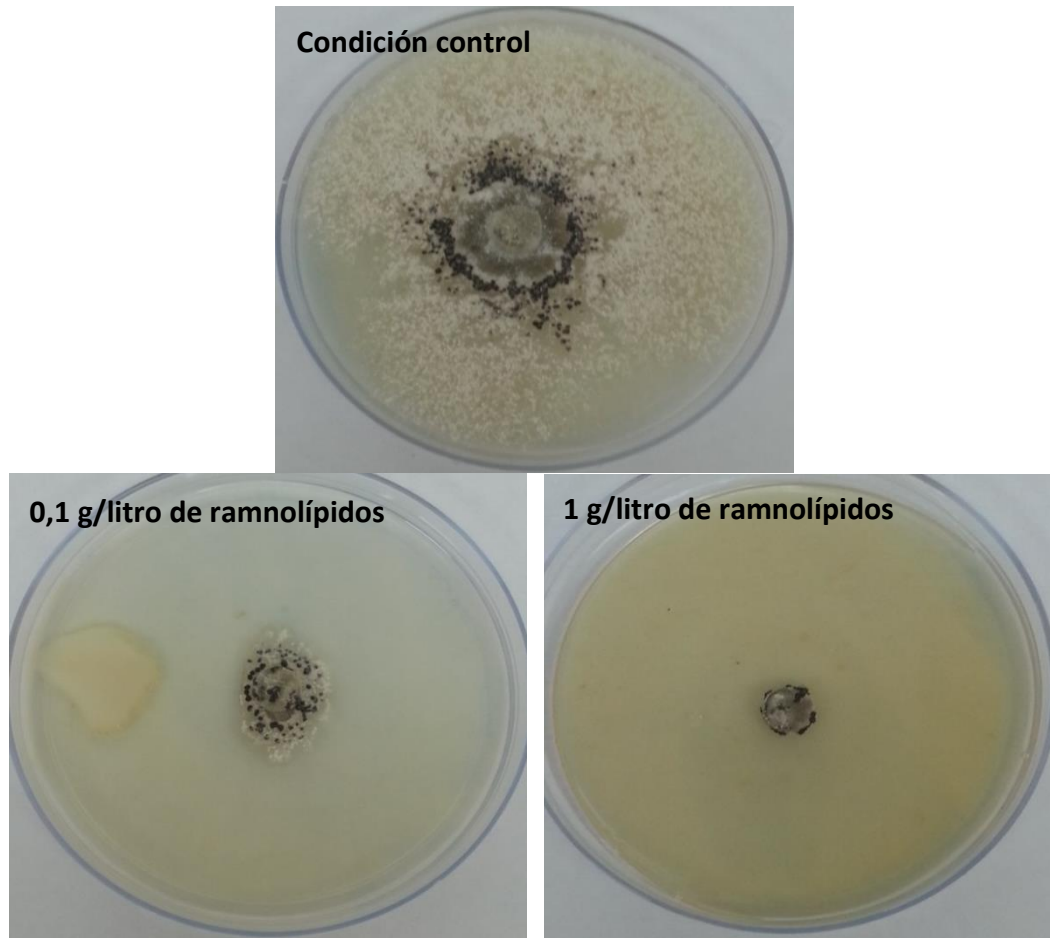


Fig. 1: *Sclerotinia minor*, agente causal del tizón de maní, utilizando diferentes dosis de ramnolípidos.

Tabla 1: Comparación de crecimiento con respecto al control de *Sclerotinia minor*.

Diámetro del halo (cm)	Condición	Crecimiento con respecto al control (%)
7,9	Control	100
2,6	0,1 g/litro ramnolípido	32
1	1 g/litro ramnolípido	12

Los datos obtenidos se observan en la figura 1 y se resumen en la Tabla 1. En el primer ensayo realizado para el caso de *Sclerotinia minor* causante de Tizón en maní, se observa una

inhibición del crecimiento del 88% con una dosis de 1g/litro de ramnolípidos y del 68% con una dosis de 0,1 g/litro de ramnolípidos con respecto al control, esto nos permite inferir que el tratamiento con ramnolípidos a estas concentraciones resultará efectivo como posible agente controlador, lo cual resultaría importante para disminuir el uso de productos químicos los cuales en algunos casos pueden llegar a ser nocivos, no solo para el medio ambiente, sino también para los microorganismos que viven en la rizosfera y que son benéficos tanto para las plantas como así también en los distintos procesos que ocurren en el suelo.

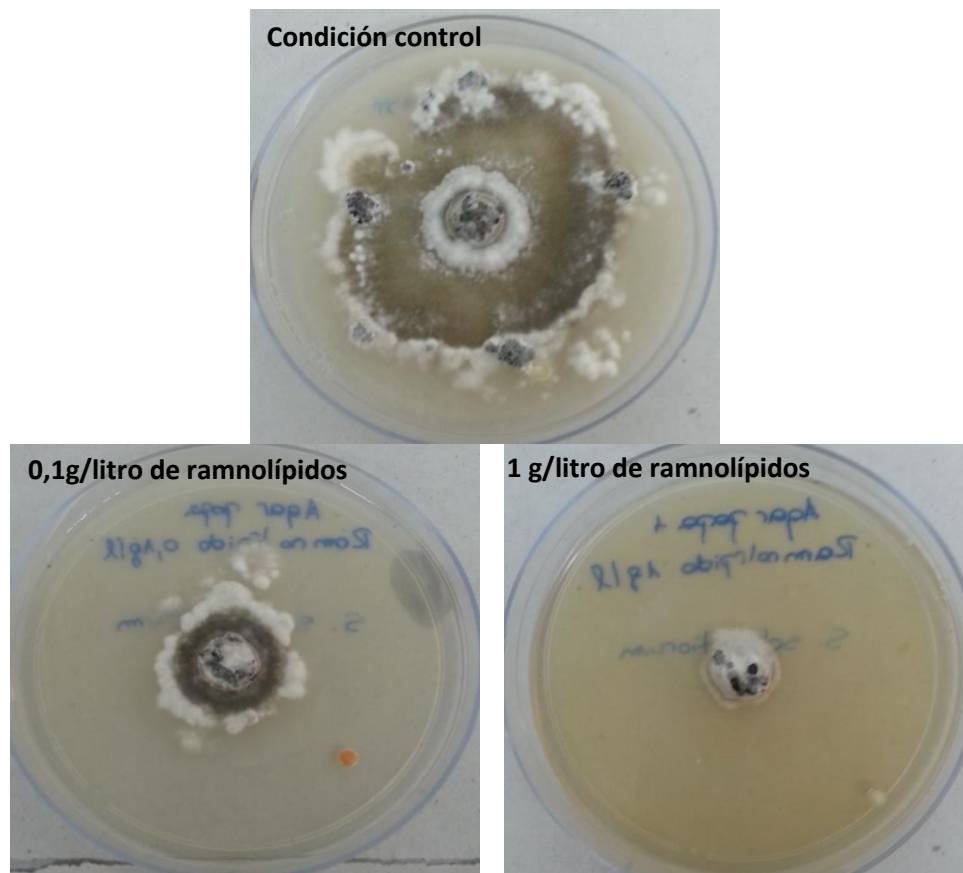


Fig. 2: *Sclerotinia sclerotiorum* agente causal del tizón de maní, utilizando diferentes dosis de ramnolípidos.

Tabla 2: Comparación de crecimiento con respecto al control de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Diámetro del halo (cm)	Condición	Crecimiento con respecto al control (%)
7,9	Control	100
3,6	0,1 g/litro ramnolípidos	45
1,4	1 g/litro ramnolípidos	17

En el caso de *Sclerotinia sclerotiorum* como se observa en la figura 2, la inhibición del crecimiento fue de 83% con dosis de 1 g/litro de ramnolípidos y de 55% con 0,1 g/litro de ramnolípidos con respecto al control, con lo cual podemos seguir corroborando que al igual que en el caso anterior el tratamiento con ramnolípidos puede resultar positivo en dichas concentraciones como controlador biológico de dichos patógenos.

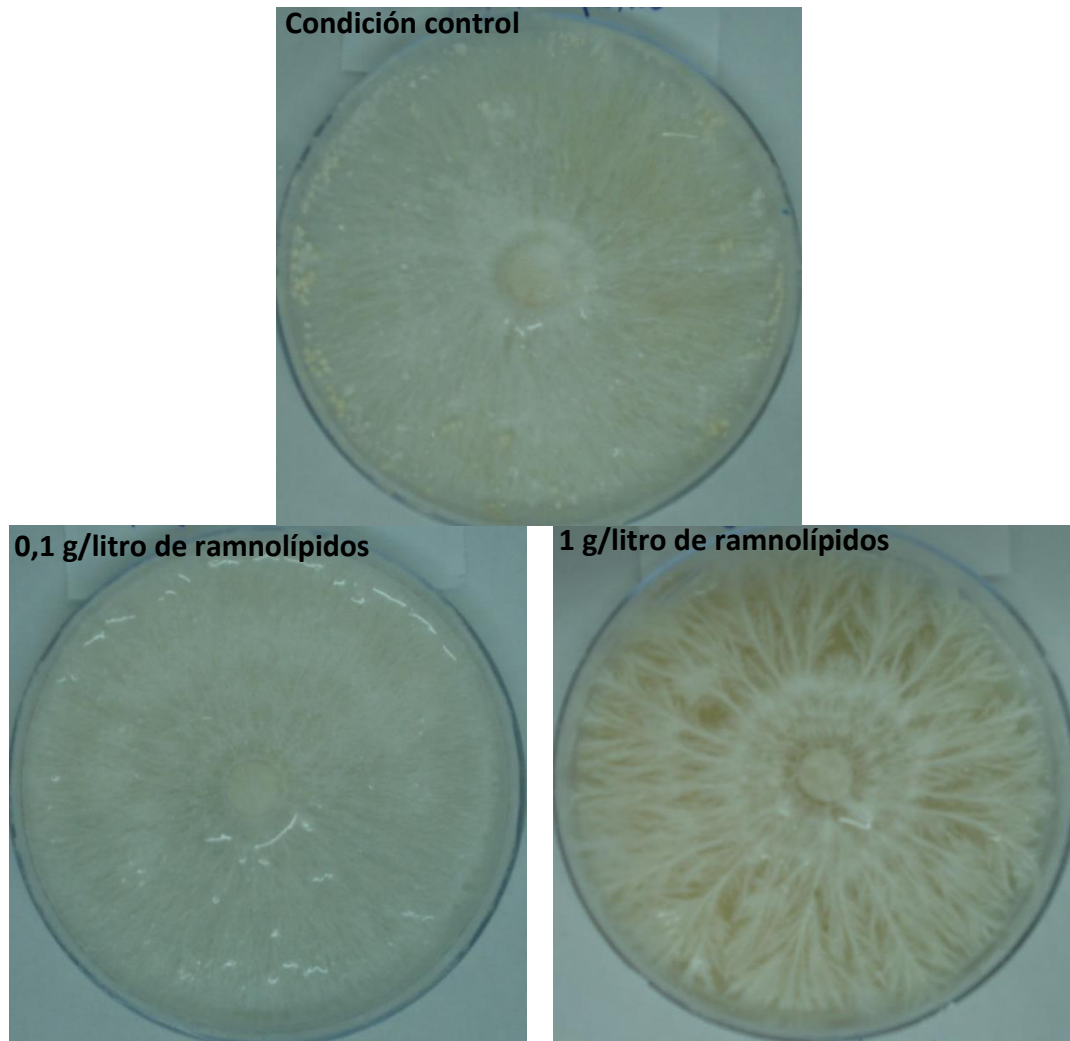


Fig. 3: *Sclerotium rolfsii*, agente causal del marchitamiento de maní, utilizando diferentes dosis de ramnolípidos.

Tabla 3: Comparación de crecimiento con respecto al control de *Sclerotium rolfsii*

Diámetro del halo (cm)	Condición	Crecimiento con respecto al control (%)
8	Control	100
8	0,1 g/litro ramnolípidos	100 (cambios morfológicos)
8	1 g/litro ramnolípidos	100 (cambios morfológicos)

En el tratamiento de este hongo en particular, *Sclerotium rolfsii* causante del marchitamiento del maní, no se registró inhibición del crecimiento como en los casos anteriores (figura 3 y tabla 3), pero si se pudo observar un cambio morfológicos, con lo cual se debería determinar si este hongo se ve perjudicado en el crecimiento, reproducción o patogenicidad en el estado que se observa con 1 g/litro de ramnolípidos.

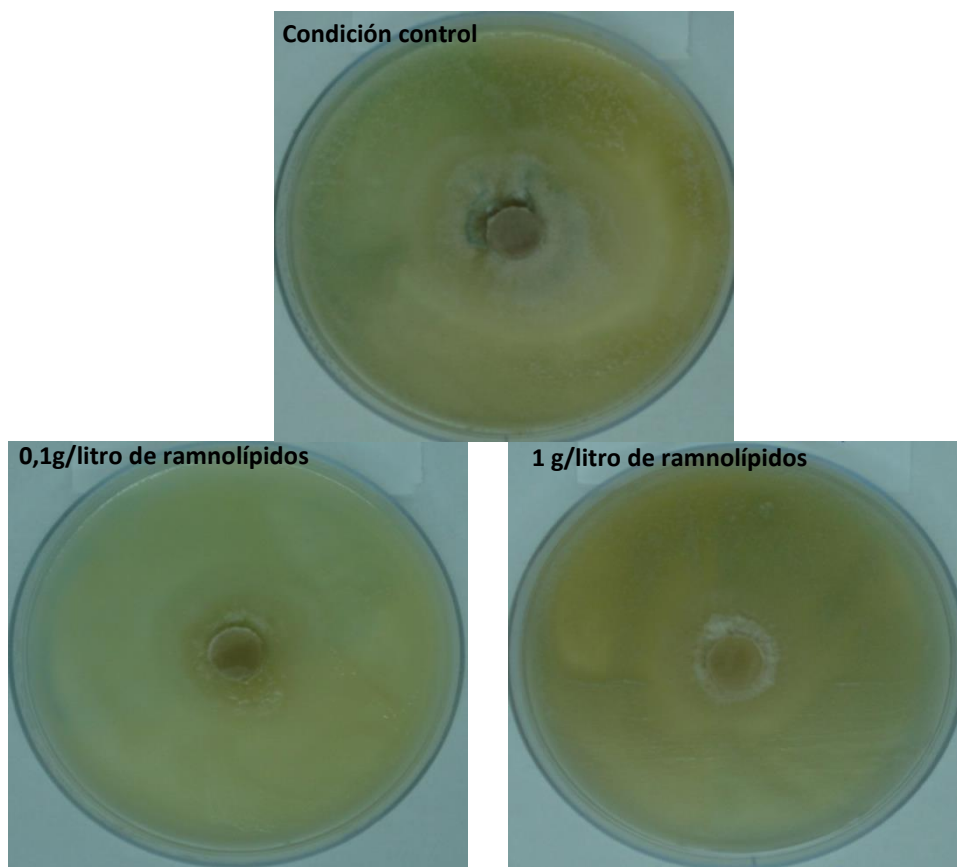


Fig. 4: *Fusarium solani*, agente causal de la podredumbre parda de la raíz de maní, utilizando diferentes dosis de ramnolípidos.

Tabla 4: Comparación de crecimiento con respecto al control de *Fusarium solani*.

Diámetro del halo(cm)	Condición	Crecimiento con respecto al control (%)
6,2	Control	100
3,7	0,1 g/litro ramnolípidos	59
3,1	1 g/litro ramnolípidos	50

En el caso de *Fusarium solani*, causante de la podredumbre parda de la raíz del maní, el crecimiento fue inhibido en un 50% con 1 g/litro de ramnolípidos y de 41% con 0,1 g/litro de

ramnolípidos, al igual que en los dos primeros casos, se puede inferir que el tratamiento con ramnolípidos en el control de los patógenos es efectivo (figura 4 y tabla 4).

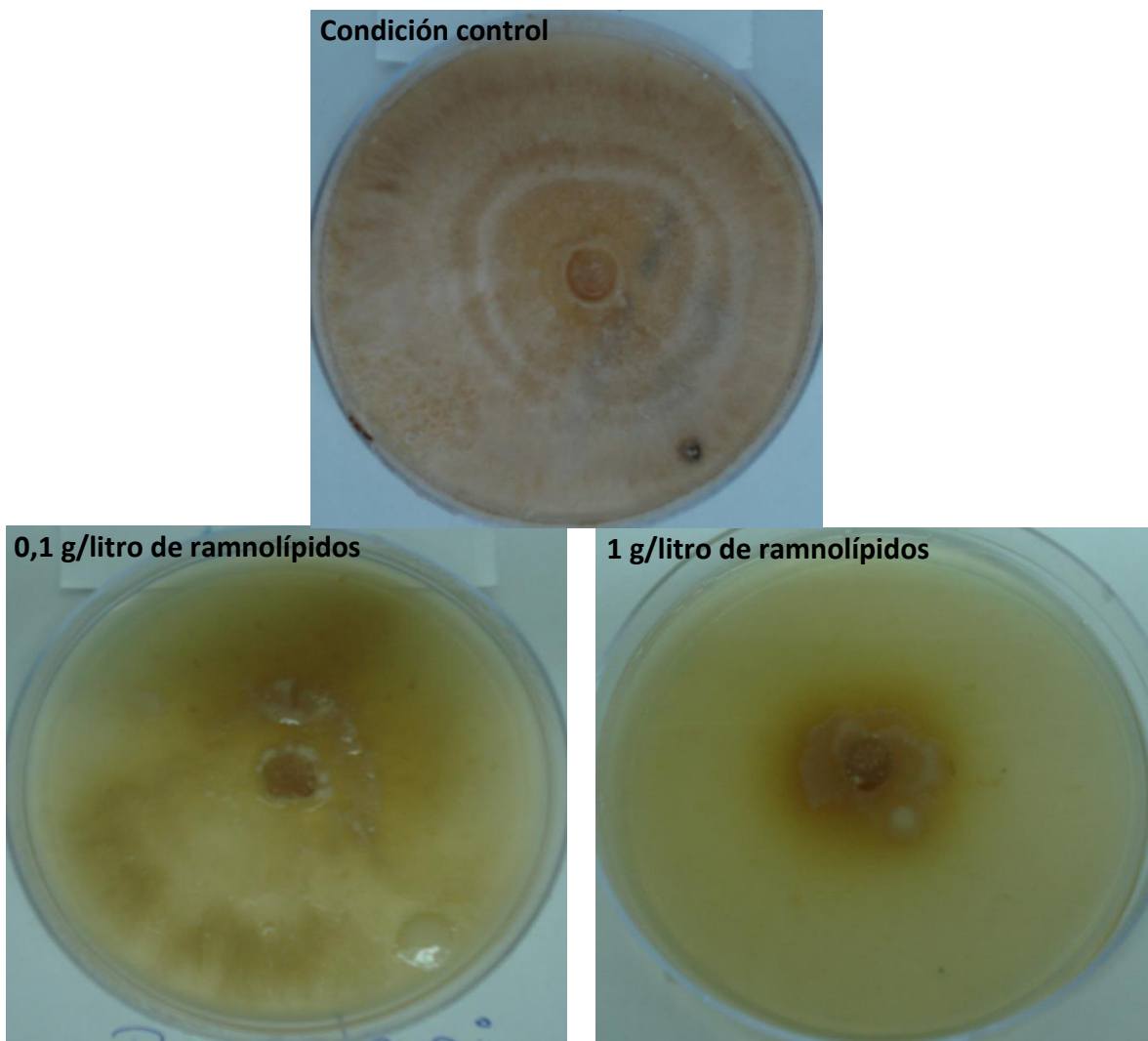


Fig. 5: Ensayo biocontrol I *Rhizoctonia solani*, agente causal de damping-off, utilizando diferentes dosis de ramnolípidos.

Tabla 5: Comparación de crecimiento con respecto al control de *Rhizoctonia solani*

Diámetro del halo (cm)	Condición	Crecimiento con respecto al control (%)
8,5	Control	100
3,4	0,1 g/litro ramnolípidos	40
3	1 g/litro ramnolípidos	35

Con *Rhizoctonia solani*, causante de Damping-off (figura 5 y tabla 5), se pudo observar que al igual que en los casos anteriores el tratamiento con ramnolípidos provocó inhibición del crecimiento en 65% y 60% con dosis de 1 g y 0,1 g/litro de ramnolípidos respectivamente.

Con los datos obtenidos en este ensayo empleando la técnica de biocontrol con medio de cultivo conteniendo ramnolipidos, se podría concluir que el tratamiento con ramnolípido es efectivo en la mayoría de los casos y que podría ser utilizado como un futuro biocontrolador de patógenos. Solo restaría estudiar cómo se desarrollaría en el medio libre, a campo, bajo condiciones ambientales naturales no controladas.

2. Ensayos de biocontrol sobre discos en diferentes concentraciones de ramnolípido

Los resultados obtenidos al haber empleado la técnica de biocontrol sobre discos en diferentes concentraciones de ramnolípido se presentan a continuación por cada especie fúngica.

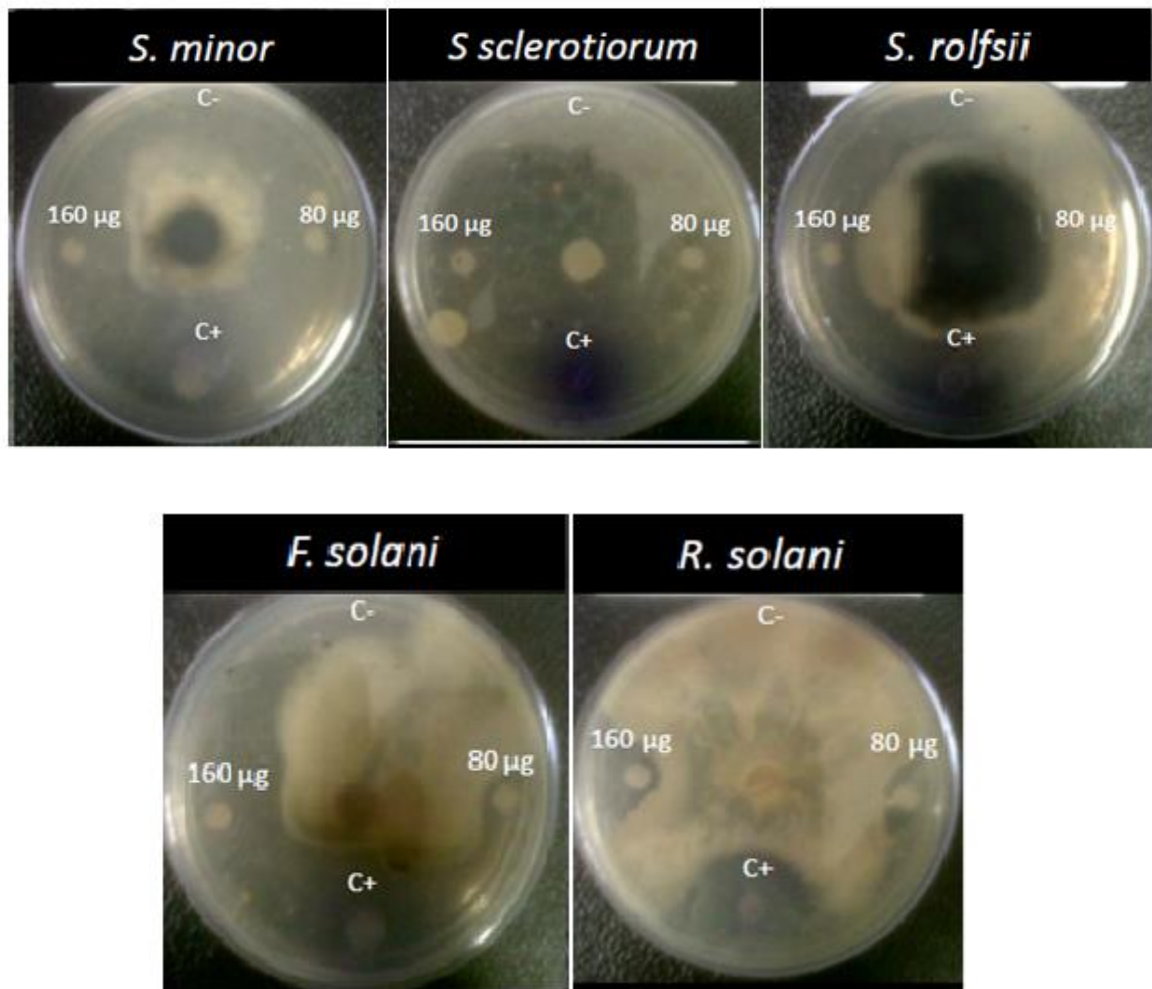


Fig. 6: Determinación del diámetro de inhibición del micelio de especies fúngicas frente a diferentes dosis de ramnolípido.

Tabla 6: Crecimiento de cada patógeno en distintas dosis de ramnolípidos, primera repetición.

Cepas de Hongos 13/11/14	4 (80 µg)	8 (160 µg)	control positivo
<i>S. minor</i>	1 cm	1,1 cm	1,5 cm
<i>S. sclerotiorum</i>	2 cm	2 cm	2 cm
<i>S. rolfsii</i>	0,5 cm	0,5 cm	0,9 cm
<i>F. solani</i>	0,2 cm	1,2 cm	1,5 cm
<i>R. solani</i>	0,2 cm	0,3 cm	1 cm

Tabla 7: Crecimiento de cada patógeno en distintas dosis de ramnolípidos, segunda repetición.

Cepas de Hongos 25/11/14	4 (80 µg)	8 (160 µg)	control positivo
<i>S. minor</i>	0,8 cm	1,2 cm	1,6 cm
<i>S. sclerotiorum</i>	1,2 cm	1,3 cm	1,4 cm
<i>S. rolfsii</i>	0 cm (sobre)	0 cm (sobre)	0 cm (sobre)
<i>F. solani</i>	0 cm (sobre)	0 cm (sobre)	0,6 cm
<i>R. solani</i>	0 cm (sobre)	0 cm (sobre)	1,2 cm

Como puede observarse en figura 6, en casi la totalidad de las especies de hongos utilizadas en el ensayo, se observa inhibición del crecimiento cuando son sometidas a las concentraciones ensayadas de ramnolípidos producidos por nuestra cepa modificada de *P. aeruginosa*.

En las tablas 6 y 7 se muestra la información de la inhibición del crecimiento de las cepas de hongos que fueron sometidos a las distintas concentraciones de ramnolípidos, los mismos se obtuvieron por determinación del diámetro de inhibición del micelio de las muestras con respecto al control positivo. Con los datos obtenidos podemos afirmar que si bien en la mayoría de los casos se observó reducción del crecimiento, se obtuvieron respuestas de inhibición mayor, como es el caso de las cepas de hongos de *S. sclerotiorum*, *S. minor* y *F. solani* en donde los valores de inhibición del diámetro del micelio del hongo a una concentración de 160µg fueron 1,3cm; 1,2cm y 1,2cm respectivamente y en cuyos casos el control positivo presentó inhibiciones de 1,4cm; 1,6cm y 1,5cm para los mismos. Para los casos de *S. rolfsii* y *R.*

solani el diámetro de inhibición del micelio fue de 0,5cm y 0,3cm respectivamente a igual dosis que en los hongos anteriores y su control positivo mostró inhibiciones de 0,9cm y 1cm.

3. Evaluación de efectos de los ramnolípidos sobre plantas de maní

Luego de establecer que existe un efecto de los ramnolípidos de *P. aeruginosa* sobre ciertos hongos patógenos de maní, se procedió a realizar un ensayo de aplicación de estas moléculas bacterianas sobre semillas de maní.



Fig. 7: Plantas de Maní de 33 días. Ensayo Pretratado, donde se adicionó a la semilla 0,1g de ramnolípidos.



Fig. 8: Plantas de Maní tratamiento 33 días. Ensayo Tratamiento, donde se adicionó a las plántulas 0,1g de ramnolípido a los 15 y 25 días.



Fig. 9: Plantas de Maní 33 días. Ensayo Pretratado, donde se adicionó a la semilla 1g de ramnolípido.



Fig. 10: Plantas de Maní tratamiento 33 días. Ensayo Tratamiento, donde se adicionó a las plántulas 1g de ramnolípido a los 15 y 25 días.



Fig. 11: Plantas de Maní Control de 33 días de crecimiento.

Los valores obtenidos de la aplicación de ramnolípidos en la semilla o sobre plantas en crecimiento se resumen en las siguientes tablas.

Tabla 8: Peso individual fresco y seco de raíz y tallos de *A. hypogaea* para cada tratamiento.

Tratamiento	Nº de planta	P. fresco Tallo (g)	P. fresco Raíz (g)	P. Seco Tallo (g)	P. Seco Raíz (g)
Control	1	7,1	1,9	0,9	0,2
Control	2	4,9	1,7	0,5	0,1
Control	3	4,9	1,6	0,6	0,1
Control	4	4,7	1,9	0,5	0,1
Control	5	5,3	2,5	0,6	0,2
Control	6	3,7	1,3	0,4	0,1
Control	7	5,6	1,4	0,7	0,1
Control	8	4,3	2,2	0,4	0,1
Pretratado 1g	1	3,1	2	0,3	0,1
Pretratado 1g	2	2,7	1,1	0,2	0
Pretratado 1g	3	3,4	1,3	0,3	0
Pretratado 1g	4	4,7	2	0,6	0,1
Pretratado 1g	5	7,6	2,9	0,9	0,3
Pretratado 1g	6	4	1,6	0,4	0,1
Pretratado 1g	7	7,3	2,3	0,8	0,2
Pretratado 0,1g	1	4,9	1,8	0,5	0,1
Pretratado 0,1g	2	5	2,1	0,5	0,2
Pretratado 0,1g	3	6,7	2,4	0,7	0,2
Pretratado 0,1g	4	4,7	1,9	0,5	0,2
Pretratado 0,1g	5	6,1	2	0,6	0,1
Pretratado 0,1g	6	5	2,1	0,4	0,1
Pretratado 0,1g	7	3,2	1,6	0,4	0,1
Tratado 0,1g	1	6,6	2,4	0,8	0,3
Tratado 0,1g	2	4,4	1,6	0,5	0,1
Tratado 0,1g	3	6,5	2,1	0,6	0,1
Tratado 0,1g	4	6,6	2	0,8	0,2
Tratado 0,1g	5	3,8	1,6	0,3	0

Tratado 0,1g	6	5,5	2,5	0,5	0,1
Tratado 0,1g	7	5	1,9	0,5	0,1
Tratado 0,1g	8	5,9	2	0,7	0,2
Tratado 1g	1	6,1	2,6	0,7	0,2
Tratado 1g	2	6,3	2,4	0,7	0,2
Tratado 1g	3	4,6	1,6	0,5	0
Tratado 1g	4	6,6	3,9	0,7	0,3
Tratado 1g	5	3,5	1,2	0,4	0
Tratado 1g	6	4,8	2,3	0,5	0,1
Tratado 1g	7	6,1	2,3	0,7	0,2
Tratado 1g	8	4,9	1,8	0,5	0,1

Tabla 9: Promedio y desvíos de pesos frescos y secos de raíz y tallos de *A. hypogaea* para cada tratamiento

	Promedio P Fresco Tallo	Promedio P Fresco Raíz	Promedio P Seco Tallo	Promedio P Seco Raíz
Control	5,0625±0,9433	1,8125±0,3756	0,575±0,1561	0,125±0,0433
Pretratado 1g	4,6857±1,8481	1,8857±0,5692	0,5±0,2507	0,1142±0,0989
Pretratado 0,1g	5,0857±1,0273	1,9857±0,2356	0,5142±0,0989	0,1428±0,0494
Tratado 1g	5,3625±1,004	2,2625±0,7581	0,5875±0,1165	0,1375±0,0992
Tratado 0,1g	5,5375±0,9949	2,0125±0,3059	0,5875±0,1615	0,1375±0,0856

Análisis de Anova

TRATAMIENTOS	
Control	I
pretratado 1g	II
pretratado 0,1g	III
tratado 1g	IV
tratado 0,1g	V

ANOVA DE PESO FRESCO TALLO

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Peso fresco tallo	38	0,05	0,00	24,88

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3,16	4	0,79	0,48	0,7511
Tratamientos	3,16	4	0,79	0,48	0,7511
Error	54,41	33	1,65		
Total	57,57	37			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,34305

Error: 1,6489 gl: 33

Tratamientos	Medias	n	E.E.
II	4,69	7	0,49 A
I	5,06	8	0,45 A
III	5,09	7	0,49 A
V	5,36	8	0,45 A
IV	5,54	8	0,45 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 10: Anova de peso fresco de tallo

ANOVA PESO FRESCO RAIZ

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Peso fresco raíz	38	0,09	0,00	26,37

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,93	4	0,23	0,84	0,5122
Tratamientos	0,93	4	0,23	0,84	0,5122
Error	9,13	33	0,28		
Total	10,06	37			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,55025

Error: 0,2768 gl: 33

Tratamientos	Medias	n	E.E.
I	1,81	8	0,19 A
II	1,89	7	0,20 A

III	1,99	7	0,20	A
IV	2,01	8	0,19	A
V	2,26	8	0,19	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 11: Anova de peso fresco de raíz

ANOVA DE PESO SECO TALLO

Análisis de la varianza

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
Peso seco tallo	38	0,05	0,00	31,68

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	0,05	4	0,01	0,43	0,7879
Tratamientos	0,05	4	0,01	0,43	0,7879
Error	1,02	33	0,03		
Total	1,07	37			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,18398

Error: 0,0309 gl: 33

<u>Tratamientos</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>
II	0,50	7	0,07
III	0,51	7	0,07
I	0,58	8	0,06
V	0,59	8	0,06
IV	0,59	8	0,06

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 12: Anova de peso seco de tallo

ANOVA DE PESO SECO RAIZ

Análisis de la varianza

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
Peso seco raiz	38	0,02	0,00	64,57

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	3,9E-03	4	9,7E-040	13	0,9684

Tratamientos	3,9E-03 4	9,7E-040,13	0,9684
Error	0,24 33	0,01	
Total	0,24 37		

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,08886

Error: 0,0072 gl: 33

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
II	0,11	7	0,03	A
I	0,13	8	0,03	A
IV	0,14	8	0,03	A
V	0,14	8	0,03	A
III	0,14	7	0,03	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 13: Anova de peso seco de raíz

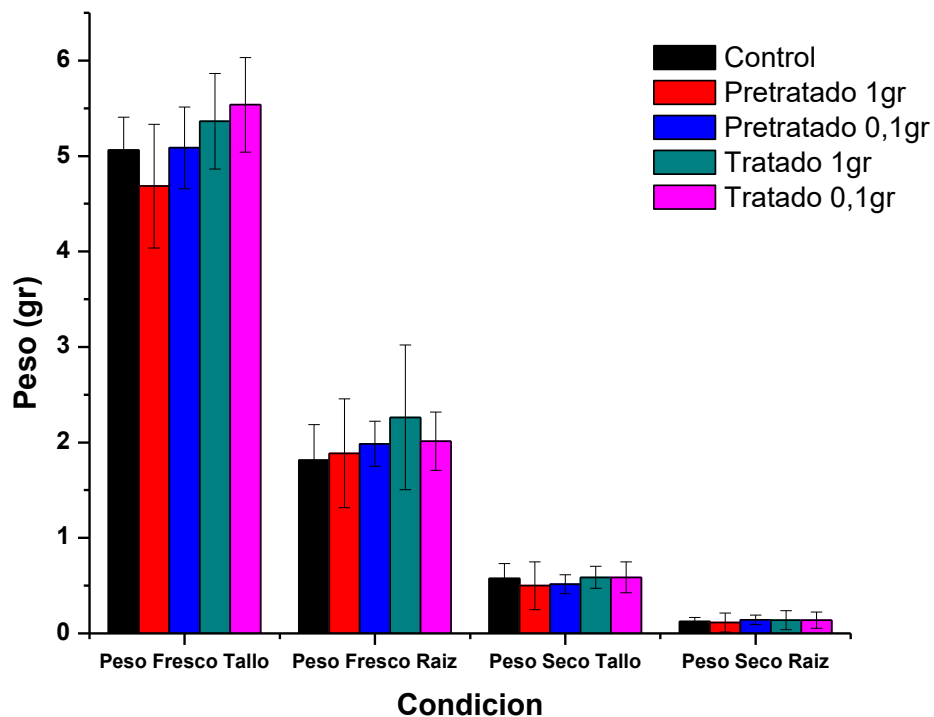


Gráfico 1: Relación peso fresco y seco de raíz y tallos para cada tratamiento.

En los resultados arrojados por este ensayo, en donde se evaluó el efecto de la aplicación de los ramnolípidos sobre semillas y sobre plantas de maní, no se observaron efectos no deseados sobre el cultivo en ninguno de los tres tratamientos realizados, si bien las plantas tratadas con ramnolípidos presentaron un leve aumento del peso promedio tanto en tallos como en raíz (tabla 9) lo cual podría indicar un efecto beneficioso sobre las plantas aunque este no fue evaluado, el mismo aumento no es significativo con respecto al resto de los tratamientos.

En los datos analizados con el test de ANOVA los resultados demuestran que no hay diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en las plantas cultivadas; con lo cual podemos concluir que las plantas no son afectadas negativamente con las dosis de ramnolípidos evaluadas.

Como puede observarse en la tabla 9 las plantas que recibieron tratamiento tanto de 1g como de 0,1 g de ramnolípidos presentaron un leve aumento en el promedio del peso fresco tanto en tallo como en raíz, en el caso del promedio de peso seco si bien también se vio un leve aumento con respecto al control este no es demasiado significativo. En las plantas en las que se realizó un pretratamiento en la semilla también se presentó un pequeño aumento en todos los casos aunque fue menor que en las plantas tratadas, esto podría indicar que las plantas que recibieron tratamiento con ramnolípidos podrían obtener beneficios en su crecimiento, para ello debería realizarse un estudio más profundo sobre las posibles causas de estos aumentos en los promedios de los pesos.

DISCUSIÓN

Las enfermedades producidas por microorganismos fitopatógenos, tales como bacterias, nematodos u hongos, constituyen la mayor causa de pérdida en la producción agrícola, tanto en cosecha como en postcosecha. Dentro de los distintos fitopatógenos, los hongos constituyen uno de los principales grupos tanto por la diversidad de especies existentes como por las pérdidas que originan. La manera tradicional de combatir tales pérdidas se basa en el empleo de compuestos químicos (control químico), los cuales se caracterizan por una elevada eficacia y por una gran rapidez en el control, pero también por ser tóxicos inespecíficos que eliminan, junto con los organismos fitopatógenos, otros organismos beneficiosos. Los inconvenientes que presenta el control químico se han potenciado en los últimos años debido al cambio en los sistemas de cultivo (monocultivos, explotaciones intensivas, etc.). Esto, unido a una mayor concienciación social ante el enorme deterioro medioambiental que supone la utilización masiva de compuestos químicos, ha provocado un gran interés en la búsqueda de sistemas de control alternativos. En este sentido, una estrategia que está dando un buen resultado es la utilización de microorganismos que son antagonistas de los agentes infecciosos y que desplazan a éstos de una manera natural (control biológico).

La evaluación que se llevó a cabo en este trabajo fue Actividad biocontroladora de ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* sobre hongos patógenos de maní.

Si bien hoy en día el estudio de ramnolípidos como agentes biofunguicidas está recién en sus comienzos; hay estudios que se han llevado a cabo de otros biosurfactantes producidos por bacterias que actúan de manera similar como biofunguicidas en diversos cultivos. Este es el caso de *Pseudomonas fluorescens* que es capaz de inhibir el crecimiento de *Phytophthora infestans* en el cultivo de papa (Rivera *et al.*, 2010) y también se ha encontrado que tiene efecto sobre *Rhizoctonia solani* (Bajsa, 2003).

De manera similar a *Pseudomonas* se encuentra *Trichoderma harzianum*, comercializadas hoy en día como controlador biológico de hongos en semillas de trigo y cereales de invierno (Rizobacter, 2014). Estos microorganismos, al igual que la abordada en esta tesis, se caracterizan por ser fáciles de aislar, de crecer y mantener en el laboratorio, no causan daños en las plantas y no afectan los organismos vivos del suelo.

Los resultados de la actividad biocontroladora de ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* sobre hongos patógenos de maní en este trabajo coinciden con las investigaciones llevadas a cabo por Bajsa (2003), quien determinó que la producción de factores antifúngicos de la cepa *Pseudomonas fluorescens* inhibe el crecimiento de *Rhizoctonia solani*.

Como puede observarse en las fotografías de las figuras 1, 2, 3, 4, 5 y 6, en casi la totalidad de las especies de hongos utilizadas en el ensayo, se observa inhibición del crecimiento cuando son sometidas a las concentraciones ensayadas de ramnolípido producidos por nuestra cepa modificada de *P. aeruginosa*.

Particularmente en el caso de *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani*, la disminución del crecimiento fue superior al 50% con 1 g/litro de ramnolípidos en el medio sólido (figura 4 y 5). Sin embargo, con *Sclerotinia minor* y *Sclerotinia sclerotiorum*, la inhibición del crecimiento fue del 100%, ya que lo que se observa en la foto es el taco de agar que se utiliza para iniciar el crecimiento del hongo en la placa de APG (figuras 1 y 2).

En algunos casos, además de la disminución del halo de crecimiento pueden observarse otros cambios, como disminución o pérdida total de las estructuras reproductivas del hongo, como puede observarse en la fotografía figura 3 como ausencia de estructuras “algodonosas blancas” cercanas al borde la placa. Específicamente en el caso de *Sclerotium rolfsii*, se puede observar un cambio morfológico muy marcado, sin embargo no se observa disminución del crecimiento (figura 3). En ese caso se debería determinar si este hongo se ve afectado en el crecimiento, reproducción o patogenicidad en el estado que se observa con 1 g/litro de ramnolípido. También concuerda con estudios realizados por Rivera (2010) en el cual se observó la respuesta de biosurfactantes producidos por *Pseudomonas fluorescens* para el control de *Phytophthora infestans*.

En ambos ensayos de Biocontrol realizados, se aprecia un efecto positivo del ramnolípido sobre los hongos tratados.

Además de los estudios mencionados anteriormente se encuentra actualmente en el mercado un controlador biológico de patógenos en semillas de trigo que esta formulado en base al hongo *Trichoderma harzanium*, reconocido por ser uno de los principales agentes de control biológico de *Fusarium graminearum*, *Bipolaris sorokiniana* y *Drechslera tritici repentis*. Este producto fue desarrollado por científicos del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola del INTA – Castelar y es comercializado por la empresa Rizobacter.

Otro aspecto de interés estudiado fue el efecto del ramnolípido sobre las plantas de maní, las cuales fueron sometidas a las dosis que resultó en la inhibición del crecimiento fúngico, en donde no se observó efectos no deseado sobre el cultivo en ninguno de los tres tratamientos realizados (figuras 7, 8, 9, 10 y 11 y tablas 8 y 9). Si bien las plantas tratadas con ramnolípidos (los cuales fueron aplicados a los 15 y 25 días de colocar las plantas en las macetas) presentaron un leve aumento del peso promedio tanto en tallos como en raíz, se podría indicar un efecto

beneficioso sobre las plantas aunque este no fue evaluado, el mismo aumento no es significativo con respecto al control (plantas sin tratamiento de ramnolípidos)

En los datos analizados con el test de ANOVA los resultados demuestran que no hay diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en las plantas cultivadas; con lo cual podemos concluir que las plantas no son afectadas negativamente con las dosis de ramnolípidos evaluadas.

En el presente trabajo si bien se obtuvieron resultados favorables, debe tenerse en cuenta que estos ensayos fueron realizados in vitro en laboratorio, sin saber cuál sería su desarrollo o comportamiento a campo en donde se pueden encontrar otros microorganismos.

Los ramnolípidos muestran efectos interesantes tal como se ven en los resultados. Donde los mismos a nivel de laboratorio demuestran ser capaces de inhibir el crecimiento de algunos hongos, lo que denota que es posible con el avance de su estudio que el mismo pueda ser utilizado en un futuro a nivel de campo como control biológico eficiente.

Por último es importante mencionar que no existen suficientes antecedentes de la respuesta de *Pseudomonas aeruginosa* como biofunguicidas frente a distintos tipos de hongos patógenos en diversos cultivos, por lo que sería interesante continuar con esta investigación para conocer cómo se comporta la especie a campo y ante distintas especies de patógenos.

CONCLUSIÓN

En este estudio se demostró que los ramnolípidos producidos por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* poseen actividad biocontroladora inhibiendo el crecimiento de hongos patógenos de cultivos de maní. En algunos casos produciendo una disminución del crecimiento superior al 50%, como fue el caso de *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani*, y en otros casos con una inhibición del 100% como lo fue para *Sclerotinia minor* y *Sclerotinia sclerotiorum*, con una dosis de 1 g/litro de ramnolípidos.

Si bien hubo una especie *Sclerotium rolfsii* en la que no se vio afectado su crecimiento, la misma sí presentó un cambio morfológico muy marcado, quedando pendiente el estudio de la inhibición de su crecimiento con una dosis de ramnolípidos mayor.

En cuanto al efecto de los ramnolípidos sobre las plantas de maní, no se han encontrado evidencias de que los mismos las afecten negativamente.

BIBLIOGRAFÍA

- ANDREANI, P. 2009. **La Argentina 2050. La revolución tecnológica del agro. Hacia el desarrollo integral de nuestra sociedad.** Coordinado por Dina Ricci - 1a ed. - Buenos Aires - Cámara de sanidad agropecuaria y fertilizantes - CASAFA, 2009. p744.
- AMARAL, P.F., M.A. COELHO, I.M. MARRUCHO Y J.A. COUTINHO. 2010. **Biosurfactants from yeasts: characteristics, production and application.** *AdvExp Med Biol* 672:236–249.
- BANAT. I.M., A. FRANZETTI, I. GANDOLFI, G. BESTETTI, M.G. MARTINOTTI, L. FRACCHIA, T.J. SMYTH Y R. MARCHANT. 2010. **Microbial biosurfactants production, applications and future potential.** *Appl Microbiol Biotechnol* 87:427–444.
- BAJSA, N. 2003. **Aislamiento de un antibiótico peptídico de *Pseudomonas fluorescens* y su efecto sobre la ultraestructura del hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*.** Montevideo
- CAMEOTRA, S.S., R.S. MAKKAR, J. KAUR Y S.K. MEHTA. 2010. **Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind.** *Adv Exp MedBiol* 672:261–280
- CHOLAKI, L., O. GIAYETTO, E. NEUMAN Y S. CAVAINAC. 1983. **Respuesta del maní (*Arachishypogaea* L.) a la inoculación al suelo con *Rhizobium*spp.** Revista UNRC 3, 173-179.
- DARDANELLI, M., M. WOELKE, P. GONZÁLEZ, M. BUENO Y N. GHITTONI. 1997. *Symbiosis* 23:73-84.
- DAS, P., S. MUKHERJEE, C. SIVAPATHASEKARAN Y R. SEN. 2010. **Microbial surfactants of marine origin: potentials and prospects.** *Adv Exp Med Biol* 672:88–101.
- DEBODE, J., K. DE MAEYER, M. PERNEEL, J. PANNECOUCQUE, G. DE BACKER Y M. HÖFTE. 2007. **Biosurfactants are involved in the biological control of *Verticilliummicrosclerotia* by *Pseudomonas* spp.** *J Appl Microbiol* 103:1184–1196.
- DOYLE, J. Y M. LUCKOW. 2003. **The rest of the iceberg Legume diversity and evolution in a phylogenetic context.** *Plant Physiol* 131, 900-910.

- GATANI, M. Y R. ARGÜELLO. 2005. **Sustainable construction materials with peanut husk base on Portland cement in Construction and Building Materials.** Elsevier.
- GOSWAMI D, JYOTI HANDIQUE P, DEKA S. 2013. **Rhamnolipid biosurfactant against *Fusarium sacchari* – the causal organism of pokkah boeng disease of sugarcane.** *J. Basic Microbiol.* 2013: (00) 1 - 10.
- HULTBERG, M., K.J. BERGSTRAND, S. KHALIL Y B. ALSANIUS. 2008. **Characterization of biosurfactant-producing strains of fluorescent pseudomonads in a soilless cultivation system.** *Antonie Van Leeuwenhoek* 94(2):329–334.
- HULTBERG, M., K.J. BERGSTRAND, S. KHALIL Y B. ALSANIUS. 2008B. **Production of biosurfactants and antibiotics by fluorescent pseudomonads isolated from a closed hydroponic system equipped with a slow filter.** *Antonie Van Leeuwenhoek* 93:373–380.
- JAZZAR, C. Y E.A. HAMMAD. 2003. **The efficacy of enhanced aqueous extracts of meliaazedarach leaves and fruits integrated with the *Camptotylusreuteri* releases against the sweet potato whitefly nymphs.** *Bull Insectol* 56:269–275.
- KIM, S.K., Y.C. KIM, S. LEE, J.C. KIM, M.Y. YUN Y I.S. KIM. 2011. **Insecticidal activity of rhamnolipid isolated from *Pseudomonas* sp. EP-3 against green peach aphid (*Myzuspersicae*).** *J Agric Food Chem* 59:934–938.
- KITAMOTO, D., H. ISODA Y T. NAKAHARA. 2002. **Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants: from energy-saving materials to gene delivery carriers.** *J Biosci Bioeng* 94:187-201.
- KRUIJT, M., H. TRAN Y J.M. RAAIJMAKERS. 2009. **Functional, genetic and chemical characterization of biosurfactants produced by plant growth-promoting *Pseudomonas putida* 267.** *J Appl Microbio* 1107:546–556.
- LAVIN, M., R. PENNINGTON, B. KLITGAARD, J. SPRENT, H. LIMA Y P. GASSON. 2001. **The dalbergioid legumes. (*Fabaceae*), delimitation of a pantropical monophyletic clade.** *Amer J Bot* 88, 503-533.
- LIN, S.C. 1996. **Biosurfactants: Recent Advances.** *J Chem Tech Biotechnol.* 66:109-120.
- LOURITH, N. Y M. KANLAYAVATTANAKUL. 2009. **Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids.** *Int J CosmetSci* 31:255–261
- MADIGAN, M.T., J.M. MARTINKO Y J. PARKER. 1997. **En: *Brock Biología de los microorganismos.***

- MARCH, G.J., A. MARINELLI, C. ODDINO Y M. KEARNEY. 2004. **Enfermedades regional de enfermedades causadas por hongos del suelo en mani.** 2 Dpto Biología Agrícola, FAV-Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
- MUKHERJEE, S., P. DAS Y R. SEN. 2006. **Towards commercial production of microbial surfactants.** *Trends Biotechnol* 24:509-515.
- NEU, T.R. 1996. **Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces.** *Microbiol Rev* 60:151-166.
- NIHORIMBERE, V., M. MARC ONGENA, M. SMARGIASSI Y P. THONART. 2011. **Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health.** *Biotechnol Agron Soc Environ* 15:327–337.
- NITSCHKEA, M. Y COSTA SGVAO. 2007. **Biosurfactants in food industry.** *Trends Food Sc. Technol.* 18:252-259.
- OCHSNER, U.A. Y J. REISER. 1995. **Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactante synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*.** *Proc Natl Acad Sci* 92:6424-6428.
- PACWA-PLOCINICZAK, P.G.A., Z. PIOTROWSKA-SEGET Y S.S CAMEOTRA. 2011. **Environmental applications of biosurfactants: recent advances.** *Int J MolSci*12:633–654.
- PEDELINI, R. 2008. **Maní, Guía Práctica para su Cultivo.** INTA General Cabrera, Córdoba, Argentina.
- RAHMAN, PKSM. Y E. GAKPE. 2008. **Production, characterization and applications of biosurfactant.** *Biothec* 7:360-370.
- RIVERA, H., E.P. MARTINEZ, J.A. OSORIO Y E. MARTINEZ. 2010. **Respuesta de biosurfactantes producidos por *Pseudomonas fluorescens* para el control de la goma de la papa *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary, bajo condiciones controladas.** *Revista Corpoica.* 11 (1): 21-30.
- RIZOBACTER. 2014. **Rizoderma, el primer y único curasemilla biológico para semillas de trigo.** <http://www.rizobacter.com/argentina/blog/rizoderma-el-primer-y-unico-curasemilla-biologico-para-semillas-de-trigo-2/>
- RODRIGUES, L., I.M. BANAT, J. TEIXEIRA Y R. OLIVEIRA. 2006. **Biosurfactants: potential applications in medicine.** *J AntimicrobChemother* 57:609-618.
- RODRIGUEZ, S.B. Y N.E MAHONEY. 1994. **Inhibition of aflatoxin production by surfactants.** *Appl Environ Microbiol* 60:106–110.

- RON, E.Z. Y E. ROSENBERG. 2001. **Natural roles of biosurfactants.** *Environ Microbiol* 3:229-236.
- SACHDEV, D.P. Y S.S CAMEOTRA. 2013. **Biosurfactants in agriculture.** *Appl Microbiol Biotechnol* 97:1005–1016.
- SANCHEZ L, COURTEAUX B, HUBERT J, KAUFFMANN S, RENAULT JH, CLÉMENT C, BAILLIEUL F, DOREY S. 2012. **Rhamnolipids elicit defense responses and induce disease resistance against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic pathogens that require different signaling pathways in *Arabidopsis* and highlight a central role for salicylic acid.** *Plant Physiology*. 160: 1630 - 1641.
- SATPUTE, S.K., A.G. BANPURKAR, P.K. DHAKEPHALKAR, I.M: BANAT Y B.A. CHOPADEV. 2010. **Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review.** *Crit Rev Biotechnol* 30(2):127–144.
- SHA, R., L. JIANG, Q. MENG, G. ZHANG Y Z. SONG. 2011. **Producing cell-free culture broth of rhamnolipids as a cost-effective fungicide against plant pathogens.** *J Basic Microbiol* 52:458–466.
- SILVA, SNRL., C.B.B. FARIAS, R.D. RUFINO, J.M. LUNA Y L.A. SARUBBO. 2010. **Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 79 (2010) 174–183.
- VAN HAMME, J.D., A. SINGH Y O.P. WARD. 2006. **Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology.** *Biotechnol Adv.* 24:604-620.